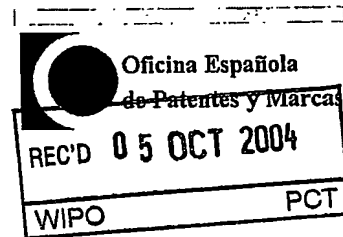




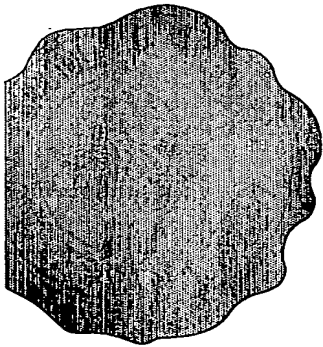
MINISTERIO
DE INDUSTRIA, TURISMO
Y COMERCIO



CERTIFICADO OFICIAL

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE de INVENCION número 200301853, que tiene fecha de presentación en este Organismo el 4 de Agosto de 2003.

Madrid, 22 de Septiembre de 2004



El Director del Departamento de Patentes
e Información Tecnológica.

P.D.

M^a DEL MAR BIARGE MARTÍNEZ

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY



INSTANCIA DE SOLICITUD

NUMERO DE SOLICITUD
P200301853

03 AGO -4 11:02

FECHA Y HORA DE PRESENTACIÓN EN LA O.E.P.M.

FECHA Y HORA PRESENTACIÓN EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.

(4) LUGAR DE PRESENTACIÓN CÓDIGO
MADRID 28

(1) MODALIDAD

☒ PATENTE DE INVENCION☐ MODELO DE UTILIDAD

(2) TIPO DE SOLICITUD

☐ ADICIÓN A LA PATENTE☐ SOLICITUD DIVISIONAL☐ CAMBIO DE MODALIDAD☐ TRANSFORMACIÓN SOLICITUD PATENTE EUROPEA☐ PCT: ENTRADA FASE NACIONAL(3) EXPR. PRINCIPAL O DE ORIGEN:
MODALIDAD

NUMERO SOLICITUD

FECHA SOLICITUD

(5) SOLICITANTE(S): APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOCIAL

NOMBRE

NACIONALIDAD

CÓDIGO PAÍS

DNI/CIF

CNAE

PYME

UNIVERSIDAD DEL PAIS VASCO-EUSKAL
HERRIKO UNIBERTSITATEA

ESPAÑOLA

ES

Q4818001B

(6) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE

DOMICILIO B° Sarriena, s/n

LOCALIDAD LEIOA

PROVINCIA VIZCAYA

PAIS RESIDENCIA ESPAÑA

NACIONALIDAD ESPAÑOLA

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Dpto. SECRETARÍA GENERAL
REPROGRAFIA
Panamá, 1 - Madrid 28071

TELEFONO

FAX

CORREO ELECTRONICO

CÓDIGO POSTAL 48940

CÓDIGO PAÍS ES

CÓDIGO NACION ES

(7) INVENTOR (ES):

APELLIDOS

NOMBRE

NACIONALIDAD

CÓDIGO
PAÍS

VER HOJA COMPLEMENTARIA ADJUNTA

(8)

☐ EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR☒ EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O ÚNICO INVENTOR

(9) MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:

☒ INVENC. LABORAL☐ CONTRATO☐ SUCESIÓN

(9) TÍTULO DE LA INVENCION

COMPUESTOS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES DESMIELINIZANTES Y AUTOINMUNES

(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:

☐ SI☒ NO

(12) EXPOSICIONES OFICIALES: LUGAR

FECHA

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:
PAIS DE ORIGENCÓDIGO
PAÍS

NÚMERO

FECHA

(14) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASAS PREVISTO EN EL ART. 162. LEY 11/86 DE PATENTES ☐(15) AGENTE/REPRESENTANTE: NOMBRE Y DIRECCIÓN POSTAL COMPLETA. (SI AGENTE P.I., NOMBRE Y CÓDIGO) (RELLENSE, ÚNICAMENTE POR PROFESIONALES)
CARPINTERO LOPEZ, FRANCISCO, 403/0, ALCALA, 35, MADRID, MADRID, 2801, ESPAÑA

(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:-

☒ DESCRIPCIÓN. Nº DE PÁGINAS: 22☒ Nº DE REIVINDICACIONES: 2☒ DIBUJOS. Nº DE PÁGINAS: 9☐ LISTA DE SECUENCIAS Nº DE PÁGINAS: 0☒ RESUMEN☐ DOCUMENTO DE PRIORIDAD☐ TRADUCCIÓN DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD☐ DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN☐ JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASAS DE SOLICITUD☐ HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA☐ PRUEBAS DE LOS DIBUJOS☐ CUESTIONARIO DE PROSPECCIÓN☒ OTROS: DISKETTE CON MEMORIA

FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE

FRANCISCO CARPINTERO LOPEZ

P.P. *[Signature]*

Colegiado Nº 252

(VER COMUNICACIÓN)

FIRMA DEL FUNCIONARIO

NOTIFICACIÓN DE PAGO DE LA TASA DE CONCESIÓN:

Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOP, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 2245/1986

ILMO. SR. DIRECTOR DE LA OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

informacion@oepr.es

www.oepr.es

C/ PANAMÁ, 1 • 28071 MADRID

MOD. 31011 - 1 - EJEMPLAR PARA EL EXPEDIENTE

NO CUMPLIMENTAR LOS RECUADROS EN MARCADOS EN ROJO



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

HOJA DE INFORMACION COMPLEMENTARIA

NÚMERO DE SOLICITUD

2200301853

FECHA DE PRESENTACIÓN

☒ PATENTE DE INVENCION

☐ MODELO DE UTILIDAD

(5) SOLICITANTES:

APELLIDOS O
DENOMINACIÓN SOCIAL

NOMBRE

NACIONALIDAD

CÓDIGO
PAÍS

DNI/CIF

CNAE

PYME

(7) INVENTORES:

APELLIDOS

NOMBRE

NACIONALIDAD

MATUTE ALMAU
ALBERDI ALFONSO
DOMERCQ GARCIA
PEREZ SANMARTIN
PEREZ CERDA
TORRE MARTINEZ
SANCHEZ GOMEZ

CARLOS
ELENA
MARIA
ALBERTO
FERNANDO
IRATXE
MARIA VICTORIA

ESPAÑOLA
ESPAÑOLA
ESPAÑOLA
ESPAÑOLA
ESPAÑOLA
ESPAÑOLA
ESPAÑOLA

(12) EXPOSICIONES OFICIALES:

LUGAR

FECHA

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:

PAÍS DE ORIGEN

CÓDIGO
PAÍS

NÚMERO

FECHA



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

NÚMERO DE SOLICITUD

P200

FECHA DE PRESENTACIÓN

RESUMEN Y GRÁFICO

RESUMEN (Máx. 150 palabras)

COMPUESTOS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES DESMIELINIZANTES Y AUTOINMUNES

La presente invención se relaciona con el tratamiento de las enfermedades desmielinizantes y autoinmunes, muy en especial con el tratamiento de la esclerosis múltiple. El tratamiento consiste en la administración de sustancias antagonistas de los receptores purinérgicos P2X₁ que produce una remisión de los síntomas propios de este tipo de enfermedades. Esto se demostró tanto en modelos celulares in vitro, como en modelos animales.

GRÁFICO

(VER INFORMACIÓN)



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA

PREVIO
DEPOSITO



Oficina Española
de Patentes y Marcas

12

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

21 NÚMERO DE SOLICITUD
P.200301853

31 NÚMERO		DATOS DE PRIORIDAD		32 FECHA	33 PAÍS	22 FECHA DE PRESENTACIÓN
71 SOLICITANTE (S) UNIVERSIDAD DEL PAIS VASCO-EUSKAL HERRIKO UNIBERTSITATEA						62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISORIA
DOMICLIO B° Sarriena, s/n LEIOA, VIZCAYA, 48940, ESPAÑA						NACIONALIDAD ESPAÑOLA
72 INVENTOR (ES) VER HOJA COMPLEMENTARIA ADJUNTA						
51 Int. Cl.					GRÁFICO (SÓLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)	
54 TÍTULO DE LA INVENCION COMPUESTOS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES DESMIELINIZANTES Y AUTOINMUNES						
57 RESUMEN COMPUESTOS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES DESMIELINIZANTES Y AUTOINMUNES La presente invención se relaciona con el tratamiento de las enfermedades desmielinizantes y autoinmunes, muy en especial con el tratamiento de la esclerosis múltiple. El tratamiento consiste en la administración de sustancias antagonistas de los receptores purinérgicos P2X lo que produce una remisión de los síntomas propios de este tipo de enfermedades. Esto se demostró tanto en modelos celulares in vitro, como en modelos animales.						

COMPUESTOS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES DESMIELINIZANTES Y AUTOINMUNES

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con el campo de las enfermedades desmielinizantes y autoinmunes, preferentemente con el de la esclerosis múltiple, así como con el empleo de sustancias antagonistas de los receptores P2X, presentes en oligodendrocitos, para el tratamiento de dichas enfermedades, y con composiciones que contengan dichos antagonistas.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La esclerosis múltiple (EM) es la enfermedad desmielinizante del sistema nervioso central más frecuente. Afecta a un millón y medio de personas en el mundo, y sus síntomas aparecen en general en adultos jóvenes, por lo que sus consecuencias a nivel personal y socioeconómico son muy graves.

Se piensa que la susceptibilidad a la EM se debe a factores genéticos y ambientales desconocidos. La prevalencia de la enfermedad se sitúa entre 50 a 100 personas por cada 100.000 habitantes en las regiones de alto riesgo, que se localizan principalmente en las zonas septentrionales del hemisferio norte, en Europa y América. El riesgo a padecer EM aumenta 10-20 veces en parientes de primer grado de enfermos, y la concordancia entre gemelos monocigóticos (idénticos genéticamente) se eleva hasta el 30-35%, mientras que gemelos dicigóticos sólo alcanza el 2-5%. La susceptibilidad genética no está caracterizada. Hasta el momento se tienen evidencias de que puede residir en algún polimorfismo de los genes que codifican antígenos leucocitarios humanos (HLA), glicoproteína oligodendrocítica de la mielina (MOG) y otros genes de los cromosomas 10 y 15.

Existe un consenso entre los investigadores de la EM según el cual la enfermedad tiene dos fases una inicial inflamatoria, de naturaleza autoinmune, y otra secundaria neurodegenerativa progresiva. En la primera, las células T activadas atraviesan la barrera hematoencefálica, y una vez dentro del Sistema Nervioso Central liberan citoquinas proinflamatorias que desencadenan una cascada inmunológica que termina en la destrucción de la mielina y muerte de los oligodendrocitos. El conocimiento con un cierto detalle del proceso autoinmune ha servido para desarrollar agentes de naturaleza inmunomoduladora cuya eficacia terapéutica es muy modesta. Sin embargo, no se ha generado ningún medicamento que retrase o detenga el avance de la fase

- neurodegenerativa de la enfermedad que cursa con deterioro neurológico progresivo e invalidez, y que se caracteriza por la aparición de lesiones desmielinizantes graves en la sustancia blanca con pérdida masiva de oligodendrocitos, atrofia y daño axonal severo. Hasta ahora se han descrito diversas dianas para la intervención durante la fase
- 5 inflamatoria de la esclerosis múltiple (Zamvil y Steinman, 2003, Neuron 38, 685-688). Entre ellas se encuentran las que se dirigen a reducir la inflamación del sistema nervioso iniciada por la activación de células T específicas de mielina, que promueven la autoinmunidad en particular contra componentes de la mielina, penetran en el tejido nervioso central y liberan en él citoquinas proinflamatorias como el interferon- γ y el
- 10 factor de la necrosis tumoral- α . El inmunomodulador interferón- β , aprobado para el tratamiento de la esclerosis múltiple remitente-recurrente, previene también las interacciones celulares que llevan a la penetración de las células T activadas a través del endotelio vascular. Otros tratamientos en fase de ensayo clínico están dirigidos a neutralizar la actividad de las citoquinas proinflamatorias y/o a potenciar las
- 15 antiinflamatorias. Un estudio reciente (Youssef et al., 2002, Nature 420, 78-84) ha puesto de manifiesto que el medicamento atorvastatin empleado en el tratamiento de la hipercolesterolemia, es también un potente inmunomodulador que puede prevenir o revertir la EAE crónica mediante la potenciación de la secreción de citoquinas antiinflamatorias y la inhibición de la producción de citoquinas proinflamatorias.
- 20 Los receptores purinérgicos son un tipo de receptores de membrana activados por purinas extracelulares como ADP y ATP y que median diversos efectos biológicos como la modulación de la actividad neuronal, la liberación de neurotransmisores, la glucogenolisis, la contractilidad de la pared vascular o ciertos procesos inmunológicos etc. Los receptores purinérgicos se clasifican en dos grandes grupos denominados P1,
- 25 cuya activación esta mediada por adenosina, y P2 cuyos ligandos endógenos son las purinas ATP y ADP y las pirimidinas UTP y UDP. Los receptores P1 transducen la señal al interior de la célula a través de proteínas G y de acuerdo con sus propiedades moleculares, bioquímicas y farmacológicas se subdividen en cuatro grupos: A1, A2A, A2B y A3. Por su parte, los P2 se dividen en ionotrópicos (P2X) y metabotrópicos
- 30 (P2Y) (Barnard y cols., 1997; Ralevic y Burnstock, 1998).
- En los últimos años se ha puesto de manifiesto que los receptores purinérgicos además de participar en señales propias de la neurotransmisión, también median efectos sobre las células gliales (Rathbone y cols., 1999). De hecho, la expresión de receptores

purinérgicos en el sistema nervioso central no está limitada solamente a neuronas, sino que afecta también a la glía (Dunn y cols., 2001; Franke y cols., 2001a; Stevens y cols., 2002). En particular, la señalización purinérgica en los astrocitos y la microglía sirve como un medio de comunicación glía-glía y glía-neurona (Fields y Stevens, 2000).

Además, algunos estudios muy recientes señalan la presencia de receptores funcionales en oligodendrocitos in vitro (Stevens y cols., 2002), que apuntan a una participación relevante en las funciones propias de este tipo celular. En particular, Stevens y cols (2002) muestran que la adenosina liberada desde los axones como consecuencia de la actividad eléctrica, inhibe la proliferación de los precursores oligodendrogiales, estimula su diferenciación y promueve la formación de mielina.

La señalización a través de receptores purinérgicos tiene también importancia en la viabilidad celular en respuesta a procesos patológicos cerebrales (revisado en Abbracchio y Burnstock, 1998). Así, están implicados en la respuesta gliótica al daño nervioso (Franke y cols., 2001b; James y Butt, 2001), y en la respuesta reparadora del sistema nervioso central mediante la producción de factores tróficos en astrocitos (Ciccarelli y cols., 2001). A su vez, la presencia de ectonucleotidasas que degradan el ATP hasta adenosina constituye un elemento neuroprotector en la isquemia (Braun y cols., 1998), mientras que el ATP produce muerte de células gliales (Honda y Kohsaka, 2001).

El conocimiento sobre la implicación del sistema purinérgico en la esclerosis múltiple es muy escaso. Esa información indica que hay alteraciones en la actividad de la 5'-nucleotidasa, el enzima que degrada ATP hasta adenosina. Dicha actividad está más elevada en monocitos sanguíneos de pacientes de esclerosis múltiple cultivados durante varios días (Armstrong y cols., 1988). Por su parte, las regiones del sistema nervioso central en las que se producen lesiones propias de la esclerosis múltiple tienen una actividad nucleotidasa más baja (Ansari y cols., 1978), lo que puede producir concentraciones más elevadas de ATP extracelular y mayor activación de los receptores purinérgicos P2.

Lo sorprendente de la presente invención se basa en el descubrimiento por parte de los inventores de que la administración de una determinada cantidad de algún antagonista de receptores P2X, ya sean de amplio espectro o específico como el ATP oxidado (o-ATP a partir de ahora), selectivo de los receptores P2X7, produce una remisión de los síntomas de la enfermedad.

COMPENDIO DE LA INVENCION

El problema a resolver por la presente invención es proporcionar una serie de compuestos para el tratamiento de las enfermedades desmielinizantes y autoinmunes, preferentemente de la esclerosis múltiple.

- 5 La solución presentada en este documento se basa en la capacidad que poseen los antagonistas de los receptores purinérgicos P2X de frenar el desarrollo de dichas enfermedades tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*.

La invención se ilustra en el ejemplo en el que se describen los ensayos llevados a cabo por los inventores en los que, por un lado, se pone de manifiesto que los
10 oligodendrocitos en cultivo expresan los receptores P2X en su superficie y, por otro, que la activación de los mismos con ATP produce un aumento del calcio citosólico y, si el estímulo es prolongado, produce finalmente la muerte de las células. Asimismo, se describen los ensayos en los que se demuestra en modelos *in vivo* e *in vitro* de esclerosis múltiple, que el tratamiento con antagonistas de receptores purinérgicos P2X frena el
15 desarrollo de la enfermedad.

Así pues, un aspecto de la invención se refiere al uso de antagonistas de receptores P2X ya sean de amplio espectro o selectivos de un determinado subgrupo de receptores (como por ejemplo el o-ATP como antagonista selectivo de los receptores P2X7) para el
tratamiento de la esclerosis múltiple y en un sentido más amplio de las enfermedades
20 desmielinizantes y autoinmunes.

El segundo aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprenda al menos uno de los mencionados antagonistas de los receptores P2X junto con al menos algún excipiente farmacéuticamente aceptable.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

25 La figura 1 muestra las propiedades electrofisiológicas de los receptores P2X en oligodendrocitos en cultivo. La activación de dichos receptores produce una corriente de entrada que se puede potenciar en ausencia de iones divalentes. Las curvas dosis-respuesta del agonista natural endógeno, ATP, y de análogos del mismo, como el
30 BzATP, indican que las propiedades de las respuestas se asemejan a las de los receptores P2X7 recombinantes expresados en sistemas heterólogos.

La figura 2 pone de manifiesto que, tanto el ATP como el BzATP producen un elevado incremento en la concentración de calcio intracelular que se evita en presencia de

PPADS, un antagonista P2X y P2Y de amplio espectro, y también eliminando el calcio del medio extracelular. Además, se observa que las respuestas se potencian con propofol y se inhiben con o-ATP, un antagonista selectivo de los receptores P2X7.

5 **La figura 3** demuestra que la aplicación durante 15 minutos de ATP o BzATP causa muerte de los oligodendrocitos en cultivo. La muerte es dependiente de calcio, pues su eliminación del medio de cultivo hace que no se produzca. El antagonista de amplio espectro PPADS es capaz de prevenirla si se coaplica a la vez que los agonistas.

La figura 4 demuestra que la muerte oligodendroglial por ATP se puede prevenir mediante el antagonista selectivo de los P2X7, el o-ATP.

10 **La figura 5** muestra la expresión in situ de receptores P2X en oligodendrocitos del nervio óptico mediante técnicas inmunohistoquímicas utilizando anticuerpos específicos. Se observa que los receptores P2X2, P2X4 y P2X7 (verde) son muy abundantes en oligodendrocitos (rojo) de nervio óptico. El color amarillo indica el solapamiento de ambos colores, por lo que los mencionados receptores se expresan
15 abundantemente en oligodendrocitos. Del mismo modo, queda claro que estos no se expresan demasiado en astrocitos.

La figura 6 muestra como la infusión lenta de (1 µl/hora) de BzATP (100 mM) produce lesiones en el nervio óptico, en las que se aprecia daño tisular con astrogliosis y microgliosis, así como desaparición de la mielina en el área dañada y rotura de los
20 axones.

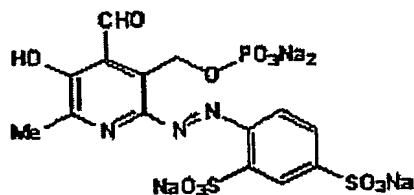
La figura 7 pone de manifiesto que las ratas a las cuales se induce EAE tienen graves síntomas neurológicos que incluyen parálisis de las extremidades e incluso muerte. Sin embargo, el tratamiento previo a la aparición de los síntomas con o-ATP produce la desaparición virtual de los síntomas.

25 **La figura 8** demuestra como, después de doce días tras la inducción de la EAE, la administración de o-ATP hace desaparecer los síntomas neurológicos causados por la enfermedad.

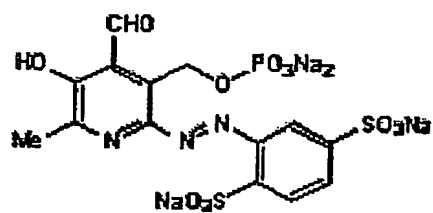
La figura 9 pone de manifiesto que en la EAE los niveles de receptores P2X2 no se alteran significativamente, sin embargo, los de P2X7 bajan de forma drástica. Esto indica que hay una pérdida de células que lo expresan, principalmente oligodendrocitos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

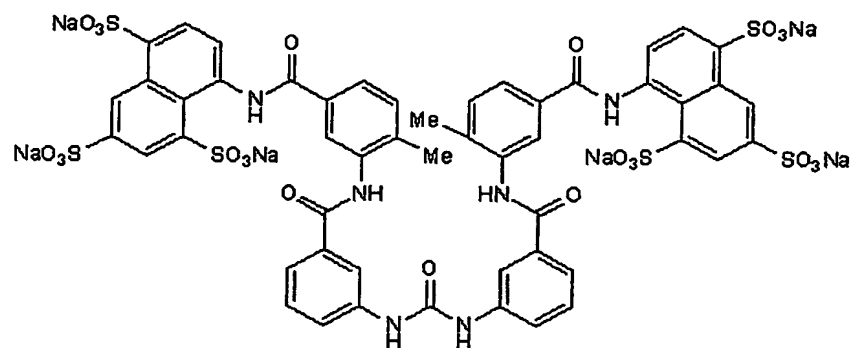
- 5 El primer aspecto de la invención se refiere al uso de los antagonistas de los receptores purinérgicos P2X para el tratamiento de las enfermedades desmielinizantes y autoinmunes. La autoinmunidad requiere la activación de una cascada precisa de procesos en células del sistema inmune. Una parte de esas células, los macrófagos y los linfocitos, expresa receptores P2X1, P2X2, P2X5 y P2X7, y la activación de este último
- 10 produce la liberación de citoquinas proinflamatorias como el factor de la necrosis tumoral α (TNF- α) e IL-1 β , así como apoptosis por mecanismos que todavía no están caracterizados (Burnstock, 2002, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 22, 364-373). Sin embargo, las funciones precisas que median los receptores P2Xs en el sistema inmune todavía no están bien caracterizadas. Es esta expresión de receptores P2X en células del
- 15 sistema inmune la que hace adecuado el uso de los antagonistas de receptores P2X para el tratamiento de las enfermedades autoinmunes. Una realización preferida de la invención contempla como enfermedad a tratar la esclerosis múltiple.
- Entre los antagonistas de los receptores P2X existen unos que son llamados de amplio espectro debido a que tienen la capacidad de unirse a varios de los receptores de la
- 20 familia P2X, aunque con diferente afinidad a cada uno de ellos; y otros que son selectivos de un determinado grupo de receptores de la familia P2X.
- Las siguientes fórmulas representan algunos de estos antagonistas de amplio espectro de los receptores P2X:



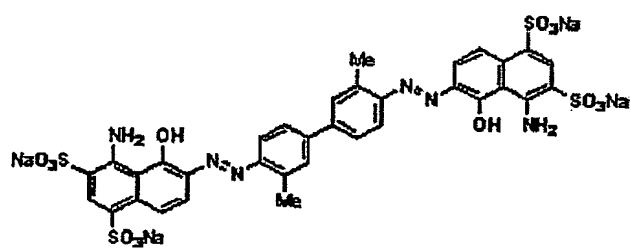
(I)



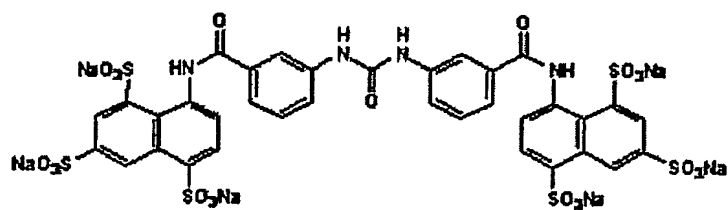
(II)



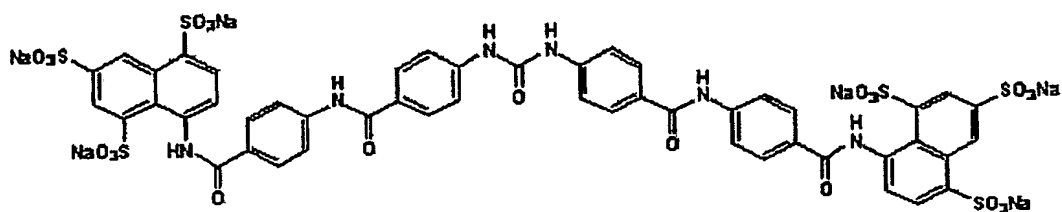
(III)



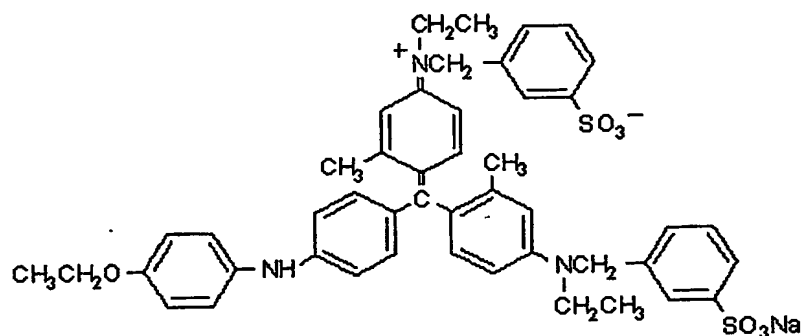
(IV)



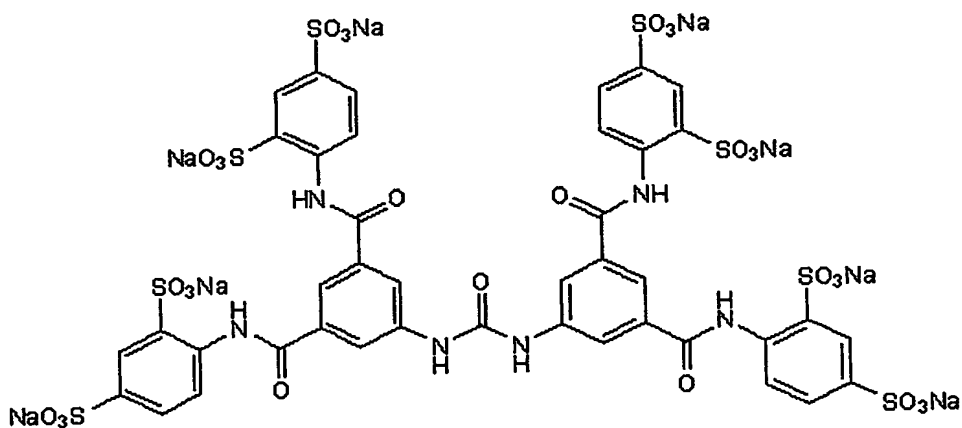
(V)



(VI)



(VII)

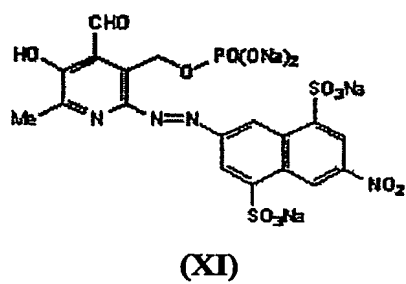
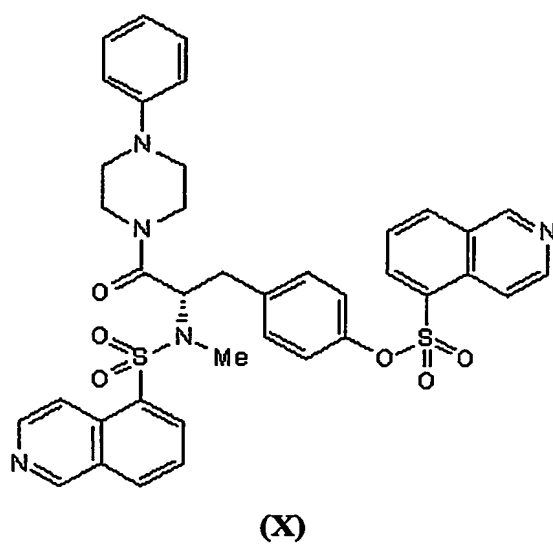
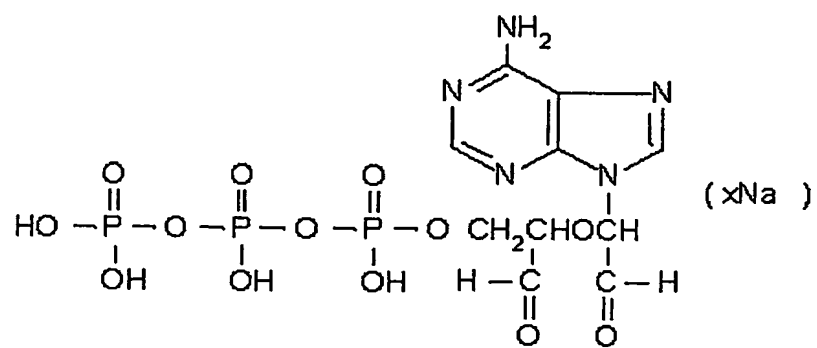


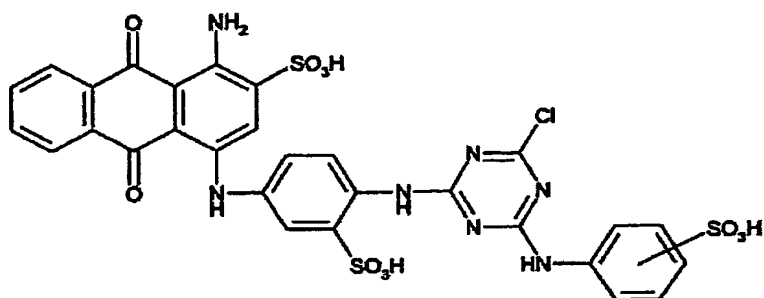
(VIII)

5

10

Las siguientes fórmulas representan los antagonistas selectivos de los receptores P2X:





(XII)

Los compuestos anteriormente representados por sus fórmulas estructurales son:

- 5 ▪ **El PPADS** (sal tetrasódica del ácido piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-disulfónico) (**I**)
- **El iso-PPADS** (sal tetrasódica del ácido piridoxalfosfato-6-azofenil-1',4'-disulfónico) (**II**)
- 10 ▪ **El Suramin** (sal hexasódica del ácido 8,8'-[Carbonilbis(imino-3,1-fenilencarbonilimino(4-metil-3,1-fenil)encarbonilimino)]bis-1,3,5-naftalentrissulfónico) (**III**)
- **El Evans Blue** (sal tetrasódica del ácido 6,6'-[(3,3'-Dimetil[1,1'-bifenil]-4,4'-diil)bis(azo)bis[4-amino-5-hidroxi-1,3-naftalendisulfónico]) (**IV**)
- 15 ▪ **El NF023** (sal hexasódica del ácido 8,8'-[carbonilbis(imino-3,1-fenilencarbonilimino)]bis-1,3,5-naftalen-trissulfónico) (**V**)
- **El NF279** (sal hexasódica del ácido 8,8'-[carbonilbis(imino-4,1-fenilencarbonilimino-4,1-fenilencarbonilimino)]bis-1,3,5-naftalentrissulfónico) (**VI**)
- **El BBG** (brillant blue coomasie G)(**VII**)
- 20 ▪ **El NF449** (sal octasódica del ácido 4,4',4'',4'''-[Carbonilbis(imino-5,1,3-benzentriil-bis(carbonilimino))]tetrakis-1,3-benzendisulfónico) (**VIII**)
- **El o-ATP** (sal sódica de Adenosina 5-trifosfato, oxidada con periodato) (**IX**)
- **El KN-62** (éster del ácido 4-[(2*S*)-2-[(5-isoquinolinilsulfonil)metilamino]-3-oxo-3-(4-fenil-1-piperazinil)propil] fenil isoquinolinsulfónico) (**X**)
- 25 ▪ **El PPNDS** (sal tetrasódica de piridoxal-5-fosfato-6-(2'-naftilazo-6'-nitro-4',8'-disulfonato) (**XI**)

- El **RB2** (ácido 1-amino-4-{{4-[[4-cloro-6-[[3 (ó 4)-sulfofenil]amino]-1,3,5-triazin-2-il]amino]-3-sulfofenil]amino}-9,10-dihidro-9,10-dioxo-2-antracensulfónico) (**XII**)

Además de los anteriormente citados existen otros antagonistas de amplio espectro como son el **MRS2220** (piridoxina- α 4,5-monofosfato-6-fenilazo-2',5'-disulfonato ciclico), el **Ip51** (sal pentapotásica de P¹,P⁵-Diinosina-5-pentafosfato) o el **TNP-ATP** (sal monolitio trisódica de 2',3'-O-2,4,6-trinitrofeniladenosina 5'-trifosfato), así como selectivos como por ejemplo el **HMA** (5-(N,N hexametilén) amilorida).

En la tabla 1 aparecen representados los IC₅₀ de algunos de los compuestos anteriores en relación con los diferentes subgrupos de receptores P2X.

Tabla 1- IC₅₀ de los antagonistas P2X en relación con cada subtipo de receptor P2X

Subtipos P2X	P2X1	P2X2	P2X3	P2X4	P2X5	P2X6	P2X7
Antagonistas: IC₅₀ (μM)	PPADS: 1-5	PPADS: 2	PPADS: 1	PPADS: 27.5	PPADS: 2.6	PPADS: >100	PPADS: 4.2
	Suramin: 1-5	Suramin: 1-5	Suramin: 3	Suramin: 178	Suramin: 4	Suramin: >100	Suramin: 4
	NF023: 0.21	NF 023: 63	NF 023: 29	NF 023: >100			
	NF279: 0.02	NF279: 0.77	NF279: 1.6	NF279: >30			NF279: 2.8
							KN-62: 0.015
	Evans Blue: 1-400	Evans Blue: 1-400	Evans Blue: 1-400	Evans Blue: 1-400	Evans Blue: 1-400	Evans Blue: 1-400	Evans Blue: 1-400
	isoPPADS: 1-5		isoPPADS: 1				
		RB-2: 1					
							HMA: 4,5
							o-ATP: 5
				BBG: >10			BBG: 0,01
	Ip51: 0,003		Ip51: 3				
	MRS2220: 10		MRS2220: 58				
	NF449: 0,01		NF449: <0.006				
	PPNDS: 0,015						

	TNP- ATP: 0.001	TNP- ATP: 1	TNP- ATP: 0,001	TNP- ATP: 15			TNP- ATP: >30
--	-----------------------	-------------------	-----------------------	--------------------	--	--	---------------------

En una realización preferida, uno de dichos antagonistas es un antagonista selectivo de los receptores P2X7, el o-ATP. En los ensayos llevados a cabo por los inventores (ver ejemplo más adelante) este compuesto se ha mostrado especialmente adecuado para 5 tratar la esclerosis múltiple debido a la importancia relativa de la presencia de receptores P2X7 en oligodendrocitos con respecto al resto de receptores P2X.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un antagonista de un receptor purinérgico P2X, ya sea de amplio espectro o 10 selectivo de un subgrupo de receptores, junto con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables serán aquellos excipientes de la técnica que permitan la formulación adecuada de la composición farmacéutica de la invención. Dicha composición puede formularse para su administración oral, intravenosa, tópica, 15 rectal, subdérmica, etc. Es decir, puede presentarse en forma de soluciones, comprimidos, cápsulas, implantes, etc. Asimismo, dicha formulación puede ser de liberación inmediata o de liberación controlada.

Los receptores de amplio espectro pueden ser seleccionados de entre los compuestos anteriormente mencionados. Una realización preferida contempla una composición 20 farmacéutica que contenga como antagonista al menos al o-ATP, selectivo de los receptores P2X7.

En el siguiente ejemplo se detallan los ensayos llevados a cabo por lo inventores que ilustran el fundamento de la invención.

25

EJEMPLO

I- PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Cultivos de oligodendrocitos

Los cultivos celulares se realizaron a partir de nervio óptico de rata perinatal (P12) siguiendo protocolos establecidos, que se adaptaron e introdujeron en el laboratorio 30 según descripción reciente (Matute y cols, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 8830-8835).

Registros electrofisiológicos en oligodendrocitos in vitro

Los registros electrofisiológicos se realizaron en cultivos de 2 a 5 días, y siguiendo las pautas indicadas en trabajos previos (Patneau y cols, 1994, Neuron12: 357-371). Las células se registraron en una cámara que permite variar la composición del medio extracelular a través de un flujo constante (0,5-1 mL/min). Los electrodos de registro fueron capilares de vidrio que contenían soluciones específicas compatibles con las concentraciones iónicas citoplasmáticas. El estudio de las respuestas mediadas por los receptores purinérgicos se realizó mediante la técnica de control de voltaje de la célula entera ("whole-cell patch-clamp"), midiendo las corrientes generadas por la aplicación externa de agonistas y antagonistas selectivos de dichos receptores.

Medición de los niveles de calcio citosólico en cultivos de oligodendrocitos

La concentración de calcio citosólico se determinó mediante el método de Grynkiewicz y cols. (1985; J. Biol. Chem. 260, 3440-3450). Los oligodendrocitos se cargaron con 5 mM de Fura-2/AM, y a continuación se lavaron y se estudiaron en un microscopio invertido Zeiss equipado con un monocromador, objetivo 40x de inmersión, una cámara digital de alta resolución Orca, y un software AquaCosmos (Hamamatsu Photonics). En estas condiciones se ensayaron los cambios en los niveles de calcio citosólico en respuesta a agonistas y antagonistas, en presencia y ausencia de calcio extracelular. La calibración se realizó al final de los ensayos mediante la aplicación sucesiva de ionomicina y EGTA, y la concentración de calcio se estimó mediante la medida del ratio 340/380 nm.

Experimentos en nervio óptico aislado

Los nervios se aislaron de ratas adultas jóvenes, y se perfundieron durante 30 min en líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa) saturado en oxígeno mediante burbujeo de 95% de oxígeno y 5% de CO₂, en condiciones comparables a las descritas para oligodendrocitos en cultivo (Fern y Möller, 2000, J. Neurosci. 20: 34-42). A continuación se incubaron con agonistas y antagonistas purinérgicos durante diversos tiempos. Posteriormente, los nervios se perfundieron durante 1 a 24 horas con LCRa normal saturado de oxígeno. Transcurrido ese tiempo el daño se evaluó histológicamente tal y como hemos descrito in vivo (Matute, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 10229-10234), y se analizaron los cambios bioquímicos que subyacen a dicho daño.

Métodos inmunoquímicos en cultivos de oligodendrocitos, nervio óptico y en tejido nervioso de animales experimentales

Se emplearon anticuerpos comerciales para el estudio de la presencia de marcadores del linaje oligodendroglial, componentes de la mielina, astrocitos y microglía. Las técnicas incluyeron la inmunocitoquímica, inmunohistoquímica e inmunoblotting (Western blot), todas ellas descritas en detalle (ver por ejemplo, Domercq y cols., 1999, Eur. J. Neurosci. 11, 2226-2236)

Aplicación de sustancias en el nervio óptico in vivo

Los experimentos en nervio óptico se realizaron en conejos (New Zealand White) que, por su tamaño, permiten una mejor manipulación quirúrgica experimental. El procedimiento empleado será el descrito previamente (Matute, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. 95, 10229-10234). Los agonistas purinérgicos se aplicaron mediante el empleo de microbombas osmóticas que liberan cantidades pequeñas de soluto durante un tiempo determinado. Posteriormente, se evaluó el efecto de dicha aplicación sobre el nervio con un panel de marcadores de oligodendrocitos y sus progenitores, mielina, integridad axonal, astrogliosis y microgliosis.

Inducción de encefalomiелitis experimental autoinmune (EAE)

Se emplearon ratas Lewis que se inmunizaron subcutáneamente con proteína básica de la mielina inyectada en las patas traseras (100 microgramos/animal en 100 microlitros) y adyuvante de Freund con 5.5 mg/ml de *Micobacterium tuberculosis* H37Ra. La médula espinal de los animales se extrajo cuando los animales tenían los síntomas de la enfermedad (12-14 post-inmunización) y se analizó la expresión de receptores purinérgicos mediante técnicas inmunoquímicas (inmunoblot e inmunohistoquímica).

II- RESULTADOS

Características de las corrientes mediadas por los receptores P2X en oligodendrocitos

El ATP (1 mM) induce una corriente de entrada que no desensibiliza en la mayoría de oligodendrocitos examinados ($77,3 \pm 7,9 \%$; $n=47$; Fig. 1a). El análogo del ATP, 2',3'-O-(4-benzoil-4-benzoil) (BzATP, 100 μ M), que es un agonista P2X de amplio espectro pero con una afinidad más alta para el receptor P2X7 (Ralevic & Burnstock, 1998), indujo también respuestas similares (Fig. 1a). Por el contrario, α,β -metilen-ATP (α,β -Me-ATP, 100 μ M), un agonista selectivo de receptores P2X1, P2X3 y heterómeros

P2X2/3, no generó corrientes en oligodendrocitos. Se observó que la amplitud de las corrientes generadas por ATP y BzATP depende de la concentración del agonista correspondiente (Fig. 1a) (EC_{50} = 8,77 mM y 0,52 mM respectivamente). Asimismo, se pudo constatar que la ausencia de Mg^{2+} y Ca^{2+} , que incrementa la concentración de ATP⁴⁻, la forma activa de los receptores P2X, potencia 4-10 las respuestas (Fig. 1 a).

El antagonista de amplio espectro PPADS (100 μ M), por su parte, bloquea completamente las corrientes inducidas por ATP (Fig. 1). A su vez, el ATP oxidado (o-ATP), un antagonista preferentemente de los receptores P2X7, bloquea parcialmente las corrientes de ATP. A su vez, el Cu^{2+} (1 mM) que es un inhibidor selectivo de los P2X7 (Virginio et al., 1997), reduce las corrientes de ATP, mientras que el propofol (60 μ M), un potenciador de los receptores P2X4, no altera dichas corrientes. Estos resultados indican que los receptores P2X presentes en oligodendrocitos tienen propiedades electrofisiológicas compatibles con un predominio de la subunidad P2X7.

La activación de los receptores P2X eleva los niveles de Ca^{2+} citosólico

Se monitorizó $[Ca^{2+}]_i$ tras aplicar ATP y BzATP con objeto de caracterizar los efectos de la activación de los receptores P2X en oligodendrocitos. Estas células responden a ATP (10 μ M) con un incremento rápido en $[Ca^{2+}]_i$ citosólico basal (250 ± 65 nM) a 1200 ± 468 nM (Fig. 2a). Estas respuestas son reprimidas en presencia de PPADS (50 μ M) y en ausencia de Ca^{2+} en la solución de incubación. Estos resultados indican que la $[Ca^{2+}]_i$ aumenta a consecuencia de la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática y no por la liberación del mismo desde los depósitos intracelulares.

El Bz-ATP (0,01-1 mM) también activa la entrada de Ca^{2+} en oligodendrocitos de forma dosis dependiente (Fig. 2b, d). Este efecto desaparece en ausencia de Ca^{2+} extracelular y se bloquea con PPADS (Fig. 2b, d). Estos resultados sugieren que los receptores P2X que contienen la subunidad P2X7 son los principales medidores de la respuesta a ATP. De acuerdo con esta idea, el antagonista selectivo de P2X7 o-ATP (1 mM) (Fernández et al., 2001), reduce un 63 ± 8 el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por Bz-ATP (Fig. 2d, e). Por su parte, el propofol (60 μ M), que potencia las respuestas mediadas por P2X4 (Tomioka et al., 2000), potencia el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ generado por 0.1 and 1 mM ATP en un 60 ± 22 and 77 ± 34 % respectivamente (Fig. 2c, d). Por tanto, los receptores nativos P2X que contienen P2X4 también contribuyen a la entrada de Ca^{2+} inducida por ATP en oligodendrocitos.

La activación de los receptores P2X induce muerte oligodendroglial Ca^{2+} dependiente

A todas las concentraciones de ATP (0,01-1 mM) ensayadas se produjo la muerte de un 15-27% de oligodendrocitos que se inhibe en presencia de 50 μM PPADS y tras quitar el Ca^{2+} del medio de cultivo (Fig. 3a). De la misma forma el agonista Bz-ATP causó una toxicidad similar al ATP (Fig. 3b). Otros agonistas purinérgicos como el ATP- γ -S, que es un análogo más estable que el ATP, y el α,β -meATP son también tóxicos para los oligodendrocitos, lo que excluye la posibilidad de que los metabolitos del ATP sean los causantes de la toxicidad tras activar receptores distintos a los P2X. En su conjunto, los ensayos de toxicidad muestran que los oligodendrocitos son vulnerables a la activación de los receptores P2X por ATP y sus análogos.

Los oligodendrocitos expresan receptores P2X en oligodendrocitos in vitro e in situ

El análisis de la expresión de receptores P2X mediante inmunohistoquímica con anticuerpos específicos en cultivos de oligodendrocitos diferenciados ($\text{GalC}^+/\text{MBP}^+$) puso de manifiesto que estas células tienen principalmente las subunidades P2X2, P2X4 y P2X7 (ver Tabla 2).

Tabla 2. Expresión de receptores P2X en cultivos de oligodendrocitos.

Subunidad	P2x ₁	P2x ₂	P2x ₃	P2x ₄	P2x ₅	P2x ₆	P2x ₇
Expresión	+/-	++	---	++	+/-	+/-	+++

Este perfil de expresión es consistente con las propiedades electrofisiológicas y las características de la toxicidad observada en estos cultivos. Además, el patrón de subunidades observado in vitro también se corresponde con el observado in situ en nervio óptico (Tabla 3) mediante doble marcado de subunidades y anticuerpos específicos del linaje oligodendroglial y astrogial (Fig.5).

Table 3. Distribución de receptores P2X en oligodendrocitos en el nervio óptico de la rata

Subunidad	P2X1	P2X2	P2X3	P2X4	P2X5	P2X6	P2X7
Distribución	-	+++	-	+++	+	-	+++

Estos resultados inmunohistoquímicos se confirmaron mediante Western blot (inmunotransferencia).

El ATP mata oligodendrocitos in situ

Para determinar si el ATP es tóxico, a los oligodendrocitos en una preparación de tejido nervioso sin disociar se perfundieron nervios ópticos enteros aislados de ratas adultas con líquido cefalorraquídeo artificial con ATP (100 μ M) durante 3 h. En estas condiciones se produjo un incremento de > 3 veces del número de células que mostraban condensación del núcleo en comparación con los nervios controles perfundidos sin ATP (Fig. 5). Las células dañadas se orientan en el eje longitudinal del nervio y forman parte de hileras de oligodendrocitos interfasciculaes. La estimulación con ATP en presencia de PPADS (10 μ M) previene de la muerte de los oligodendrocitos.

A continuación, se infundieron los agonistas ATP- γ -S y BzATP sobre el nervio óptico in vivo mediante bombas osmóticas que liberan cantidades de soluto muy pequeñas a lo largo de 3 días. El examen histológico de los nervios a 7 días de inicias la aplicación mostró daño tisular en un área restringida a la proximidad de la canula (Fig. 6). Además, dicha zona presentaba una gliosis intensa, falta de mielina y daño axonal (Fig. 6). En su conjunto esto resultados indican que la activación de los P2X mata oligodendrocitos in situ y que las lesiones in vivo comparten propiedades propias de las placas de esclerosis múltiple.

El bloqueo de los P2X mejora los síntomas motores de la EAE aguda y crónica

Se investigaron los efectos del antagonista de amplio espectro PPADS y del más selectivo o-ATP en el desencadenamiento y curso de la EAE inducida por inmunización de ratas Lewis con proteína básica de la mielina. Las ratas inmunizadas mostraron signos de déficits motores alrededor de los 10 días postinyección, y alcanzaron un máximo a los 14 días (Fig. 7). El tratamiento con PPADS (30 mg/kg, dos veces al día) desde los 7 a los 14 días postinyección no mejoró los síntomas y el curso de la enfermedad. En cambio la aplicación de o-ATP (1 y 5 mg/kg, cada 12 h) durante el mismo periodo atenuó o previno la aparición de los síntomas propios de la EAE (Fig. 7).

Posteriormente se evaluó la eficacia del o-ATP en mejorar los síntomas de la EAE en un modelo remitente-recurrente-crónico. Para ello, se inmunizaron ratas DA con médula espinal singénica observándose la aparición de déficits neurológicos severos a los 7-9 días postinyección, y que alcanzaban su primer pico entorno a los 11 días. El tratamiento con o-ATP (2,5 mg/kg, cada 12 h) una vez instaurados la intensidad máxima de los síntomas los redujo los síntomas y también eliminó aquellos propios de la fase crónica (Fig. 8).

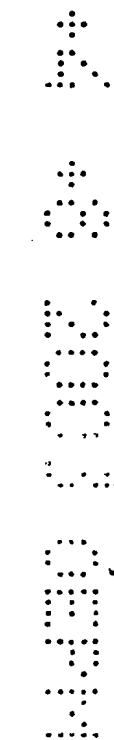
Con objeto de conocer el mecanismo de acción por el que el o-ATP mejora el pronóstico de la EAE, se evaluaron mediante Western blot los niveles del receptor P2X7 sobre el que actúa de forma preferente este fármaco en la médula espinal lumbosacra, la región más afectada en esta enfermedad experimental. Encontramos que los niveles de esta subunidad se reducían a la mitad en los animales sometidos a EAE, y que dichos niveles retornaban a los de los controles en aquellos animales con EAE tratada con o-ATP (Fig. 9). Estos resultados indican que el tratamiento con o-ATP protege de la muerte a las células que expresan P2X7, y por ende a los oligodendrocitos que son el principal tipo celular que expresa dicha subunidad en la médula espinal.

III- DISCUSIÓN

Los resultados mostrados anteriormente ponen de manifiesto por primera vez que los oligodendrocitos tienen receptores P2X. Asimismo, se detallan las propiedades electrofisiológicas, farmacológicas y moleculares de estos receptores, así como su elevada permeabilidad a calcio. Esta última propiedad hace que los oligodendrocitos sean vulnerables a los estímulos intensos y/o prolongados mediados por estos receptores, al igual que se ha demostrado con los receptores glutamatérgicos en esta población celular (Matute et al., 2001, Trends Neurosci 24, 224-230). La vulnerabilidad de los oligodendrocitos a las señales mediadas por los receptores P2X es una de las causas del daño en el tejido nervioso que subyace a la enfermedad experimental EAE, un modelo de esclerosis múltiple. Finalmente, el bloqueo de los receptores P2X hasta del desencadenamiento de la enfermedad reduce drásticamente los síntomas neurológicos en la EAE aguda, y mejora la evolución y pronóstico en la EAE crónica una vez instaurada la sintomatología.

La invención aquí descrita constituye una vía para el tratamiento de la esclerosis múltiple, una enfermedad que carece de tratamientos eficaces que ralenticen o frenen su progresión. Las vías de intervención que han resultado en el desarrollo de fármacos en

fase de ensayos clínicos o de uso como medicamentos en el tratamiento de la esclerosis múltiple tienen mecanismos de acción que regulan el funcionamiento del sistema inmune. El hecho de que el bloqueo de los P2X prevenga los síntomas de la EAE aguda, un modelo de EM que mimetiza la fase inflamatoria/autoinmune de la enfermedad, indica que estos fármacos pueden ser de hecho potentes agentes inmunomoduladores que eviten la autoinmunidad que desencadena la EM y otras enfermedades. Finalmente, los antagonistas de los receptores P2X al ser agentes protectores de la muerte de los oligodendrocitos, la población celular que sufre mayor daño en la EM, tienen un gran potencial terapéutico en la fase neurodegenerativa de esta enfermedad, fase que se prolonga durante decenios y en la que los pacientes sufren un deterioro progresivo que cursa con trastornos motores y sensitivos que produce invalidez.



BIBLIOGRAFÍA

- **Abbracchio, M.P. and Burnstock, G. (1998)** Purinergic signalling: pathophysiological roles. *Jpn. J. Pharmacol.* 78: 113-145.
- **Ansari KA, Rand A, Loch JA (1978)** Biochemical and immunological studies with human optic and olfactory tracts *J Neuropathol Exp Neurol* 37:756-67
- **Armstrong MA, Shah S, Hawkins SA, Bell AL, Roberts SD (1988)** Reduction of monocyte 5'nucleotidase activity by gamma-interferon in multiple Ann *Neurol* 24:12-6
- **Barnard, E.A., Simon, J. and Webb, T.E. (1997).** Nucleotide receptors in the nervous system. An abundant component using diverse signal transduction mechanisms. *Mol. Neurobiol.* 15: 103-129.
- **Braun, N., Zhu, Y., Krieglstein, J., Clumsee, C. and Zimmermann, H. (1998).** Upregulation of the enzyme chain hydrolysing extracellular ATP after transient forebrain ischemia in the rat. *J. Neurosci.* 18: 4891-4900.
- **Ciccarelli, R. Ballerini, P., Sabatino, G., Rathbone, M.P., D'Onofrio, M., Caciagli, F. and Iorio, P. (2001).** Involvement of astrocytes in purine-mediated reparative processes in the brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* 19: 395-414.
- **Dunn, P.M., Zhong, Y. and Burnstock, G. (2001).** P2X receptors in peripheral neurons. *Prog. Neurobiol.* 65:107-134.
- **Fields, R.D. and Stevens, B. (2000).** ATP: an extracellular signalling molecule between neurons and glia. *Trends Neurosci.* 23: 625-633.
- **Franke, H., Grosche, J., Schädlich, H., Krügel, U., Allgaier, C. and Illes, P. (2001a).** P2X receptor expression on astrocytes in the nucleus accumbens of rats. *Neuroscience* 108: 421-429.
- **Franke, H., Krügel, U., Schmidt, R., Grosche, J., Reichenback, A. and Illes, P. (2001b).** P2 receptor-types involved in astrogliosis in vivo. *Brit. J. Pharmacol.* 134: 1180-1189.
- **Honda, S. and Kohsaka, S. (2001).** Regulation of microglial cell function by ATP. *Nihon Shinke* 21: 89-93.
- **James, G. and Butt, A.M. (2001).** Changes in P2Y and P2X purinoceptors in reactive glia following axonal degeneration in the rat optic nerve. *Neurosci. Lett.* 212: 33-36.
- **Matute C, Alberdi E, Domercq M, Pérez-Cerdá F, Pérez-Samartín A and Sánchez-Gómez MV (2001)** The link between excitotoxicity and demyelinating diseases. *Trends Neurosci.* 24, 224-230.

- **Matute C, Alberdi E, Ibarretxe G and Sánchez-Gómez MV** (2002) Excitotoxicity in glial cells. *Eur. J. Pharmacol* 447:239-246.
- **Queiroz, G., Gebicke-Haerter, P.J., Schobert, A., Starke, K. and von Kugelgen, I.** (1997). Release of ATP from cultured rat astrocytes elicited by glutamate receptor activation. *Neuroscience* 78: 1203-1208.
- **Ralevic, V. and Burnstock, G.** (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 50: 413-492.
- **Rathbone, M.P., Meddlemiss, P.J., Gysbers, J.W., Andrew, C., Herman, M.A., Reed, J.K., Ciccarelli, R. Di Iorio, P. and Caciagli, F.** (1999). Trophic effects of purines in neurons and glia. *Prog. Neurobiol.* 59: 663-690.
- **Stevens, B, Porta, S., Haak, L.L., Gallo, V. and Fields, R.D.** (2002) Adenosine: a neuron-glial transmitter promoting myelination in the CNS in response to action potentials. *Neuron* 36: 855-868.
- **Zamvil, S.S. and Steinman L.** (2003) Diverse targets for intervention during inflammatory and neurodegenerative phases of multiple sclerosis. *Neuron* 38, 685-688.

REIVINDICACIONES

- 5 1- Antagonista de un receptor purinérgico P2X para el tratamiento de enfermedades desmielinizantes y autoinmunes, preferiblemente de la esclerosis múltiple, en mamíferos incluido el hombre.
- 10 2- Antagonista de un receptor purinérgico P2X para el tratamiento de enfermedades desmielinizantes y autoinmunes de acuerdo con la reivindicación 1 caracterizado porque el receptor purinérgico es preferentemente un receptor P2X7.
- 15 3- Antagonista de un receptor purinérgico P2X para el tratamiento de las enfermedades desmielinizantes y autoinmunes de acuerdo con la reivindicación 1 caracterizado porque el antagonista es un antagonista de amplio espectro para receptores P2X o un antagonista selectivo de un receptor P2X7, como el o-ATP.
- 20 4- Antagonista de un receptor purinérgico P2X para el tratamiento de enfermedades desmielinizantes y autoinmunes de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3 caracterizado porque dicho antagonista se puede seleccionar de entre el PPADS, iso-PPADS, Suranim, Evans Blue, NF023, NF279, BBG, NF449, o-ATP, KN62, PPNDS, RB2, MRS2220, Ip51, TNP-ATP o HMA.
- 25 5- Empleo de un antagonista de los receptores purinérgicos P2X en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades desmielinizantes y autoinmunes, preferiblemente de la esclerosis múltiple, en mamíferos incluido el hombre.
- 30 6- Empleo de un antagonista de los receptores purinérgicos P2X de acuerdo con la reivindicación 5 caracterizado porque dichos receptores purinérgicos son preferentemente receptores P2X7.
- 7- Empleo de un antagonista de los receptores purinérgicos P2X de acuerdo con la reivindicación 5 caracterizado porque dicho antagonista es un antagonista de amplio

espectro para receptores P2X o un antagonista selectivo de un receptor P2X7, como el o-ATP.

- 5 8- Empleo de un antagonista de los receptores purinérgicos P2X de acuerdo con la reivindicación 5 a 7 caracterizado porque dicho antagonistas se puede seleccionar de entre el PPADS, iso-PPADS, Suranim, Evans Blue, NF023, NF279, BBG, NF449, o-ATP, KN62, PPNDS, RB2, MRS2220, Ip51, TNP-ATP o HMA.
- 10 9- Composición farmacéutica que comprende al menos un antagonista de un receptor purinérgico P2X y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 15 10- Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9 caracterizada porque el antagonista es un antagonista de amplio espectro para receptores P2X o un antagonista selectivo de un receptor P2X7, como el o-ATP.
- 20 11- Composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 9 a 10 caracterizada porque dicho antagonista se selecciona de entre el PPADS, iso-PPADS, Suranim, Evans Blue, NF023, NF279, BBG, NF449, o-ATP, KN62, PPNDS, RB2, MRS2220, Ip51, TNP-ATP o HMA.

Figura 1

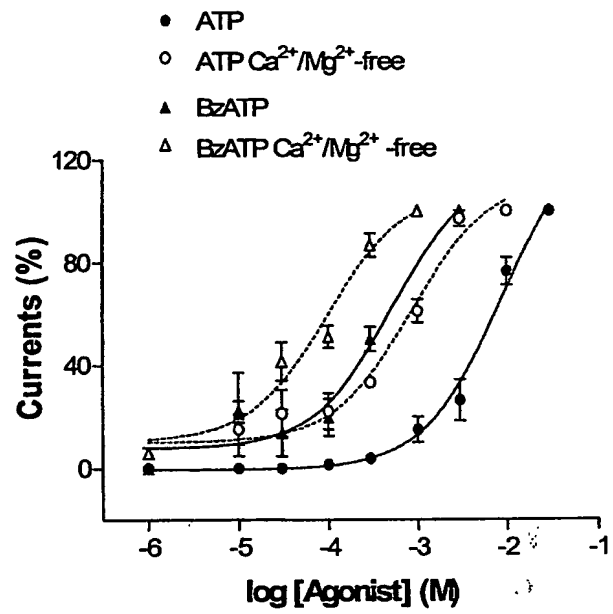
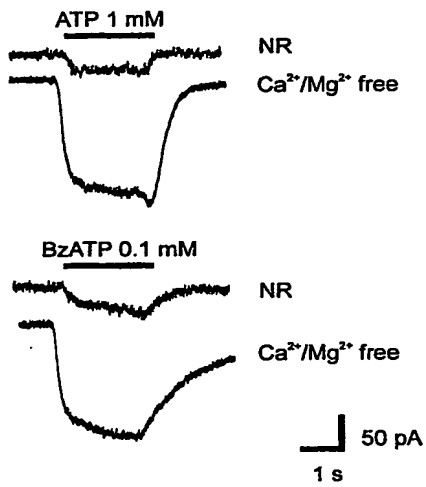


Figura 2

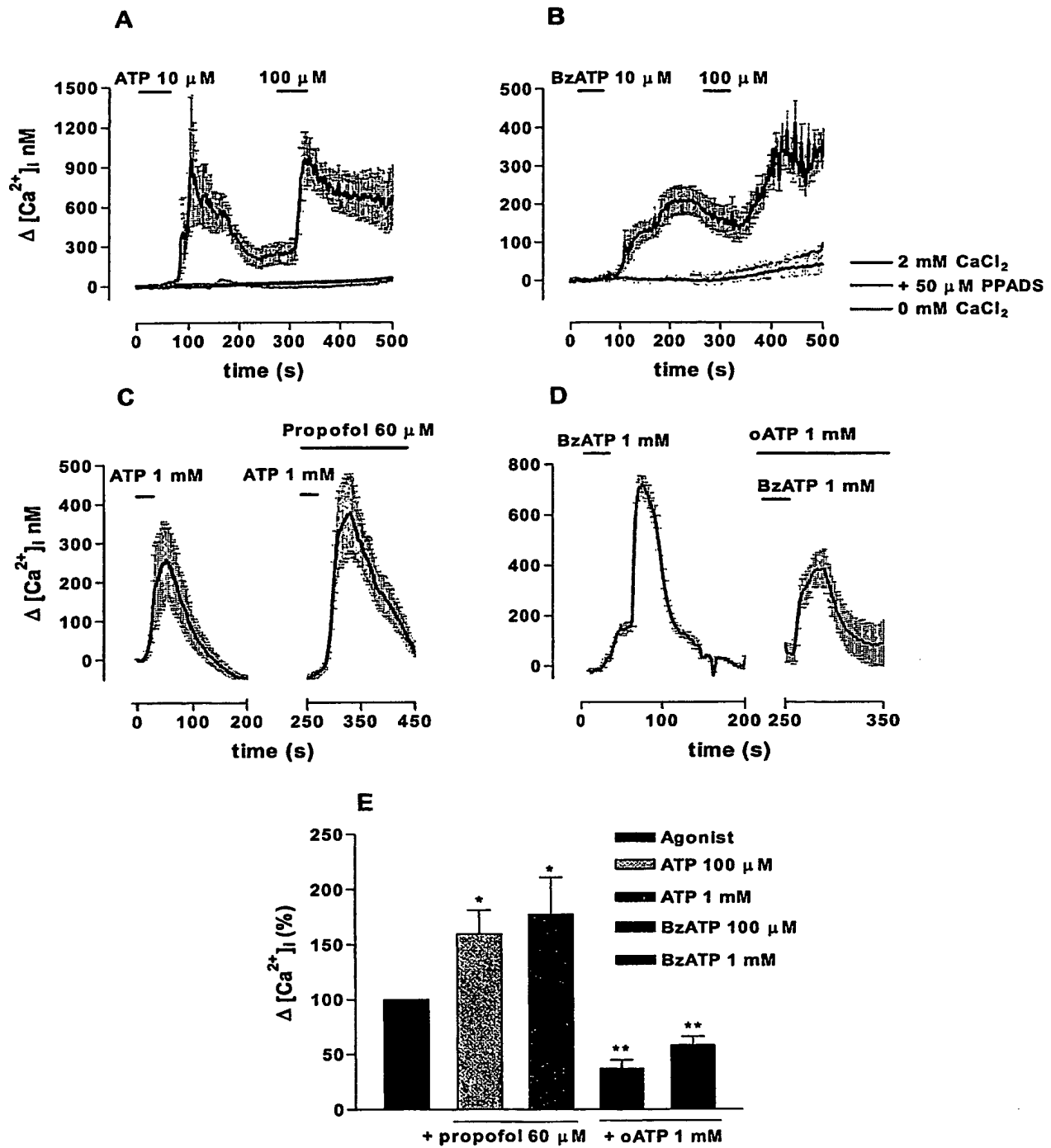


Figura 3

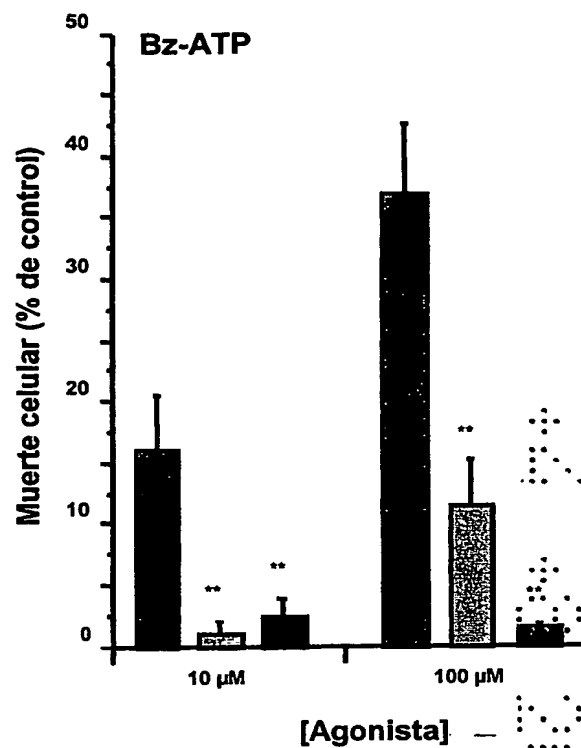
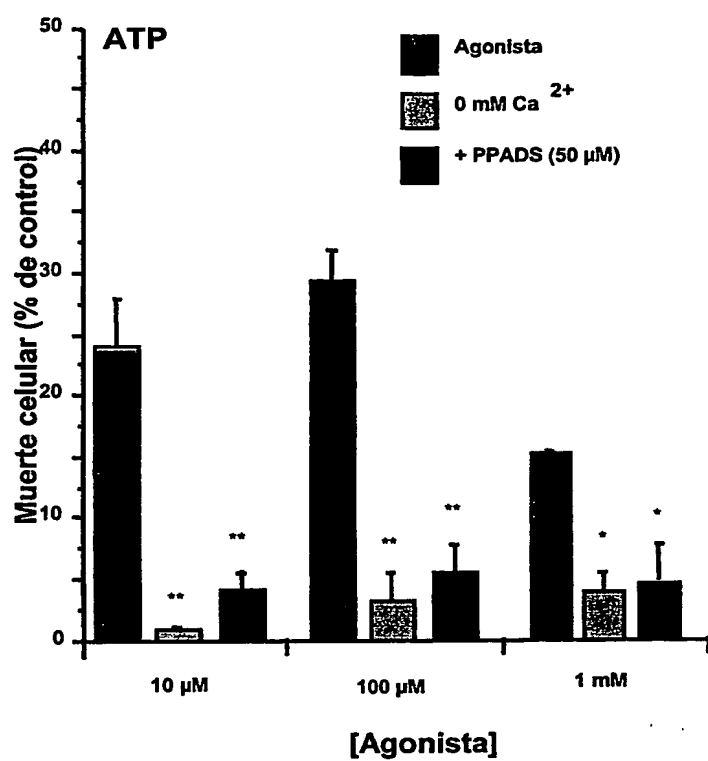


Figura 4

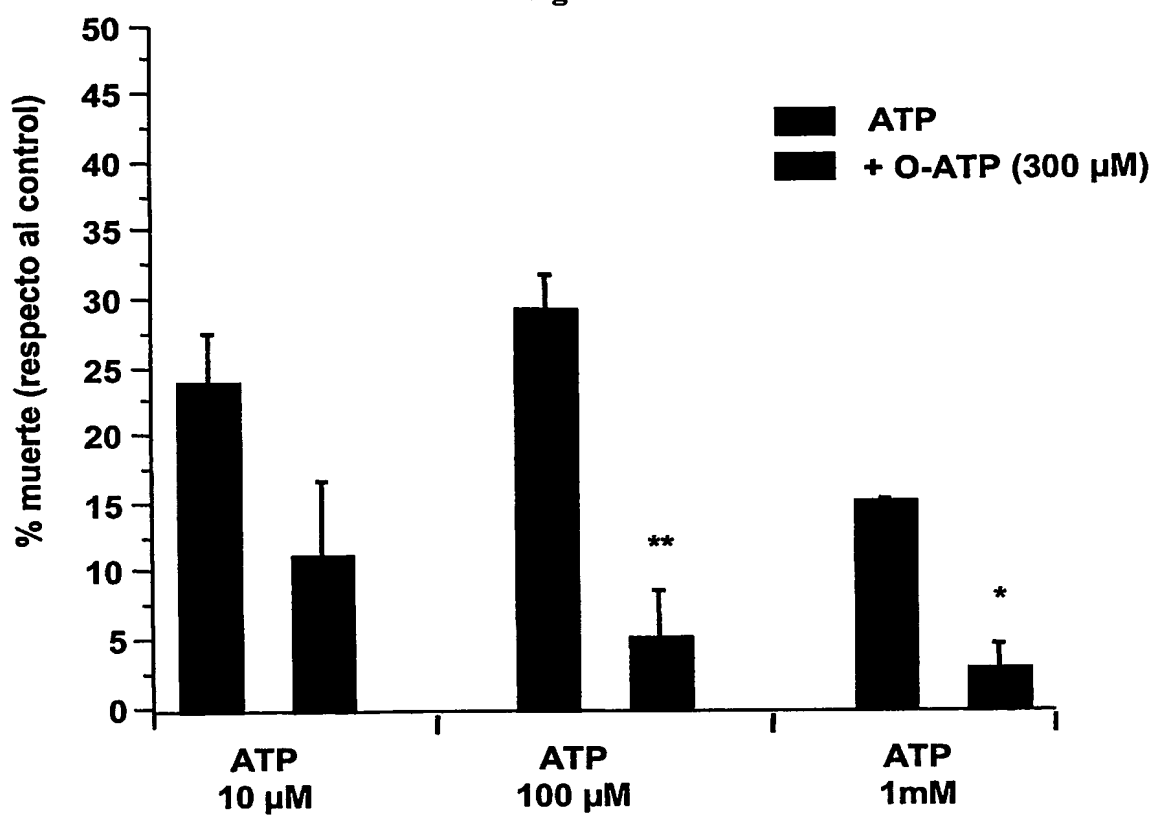
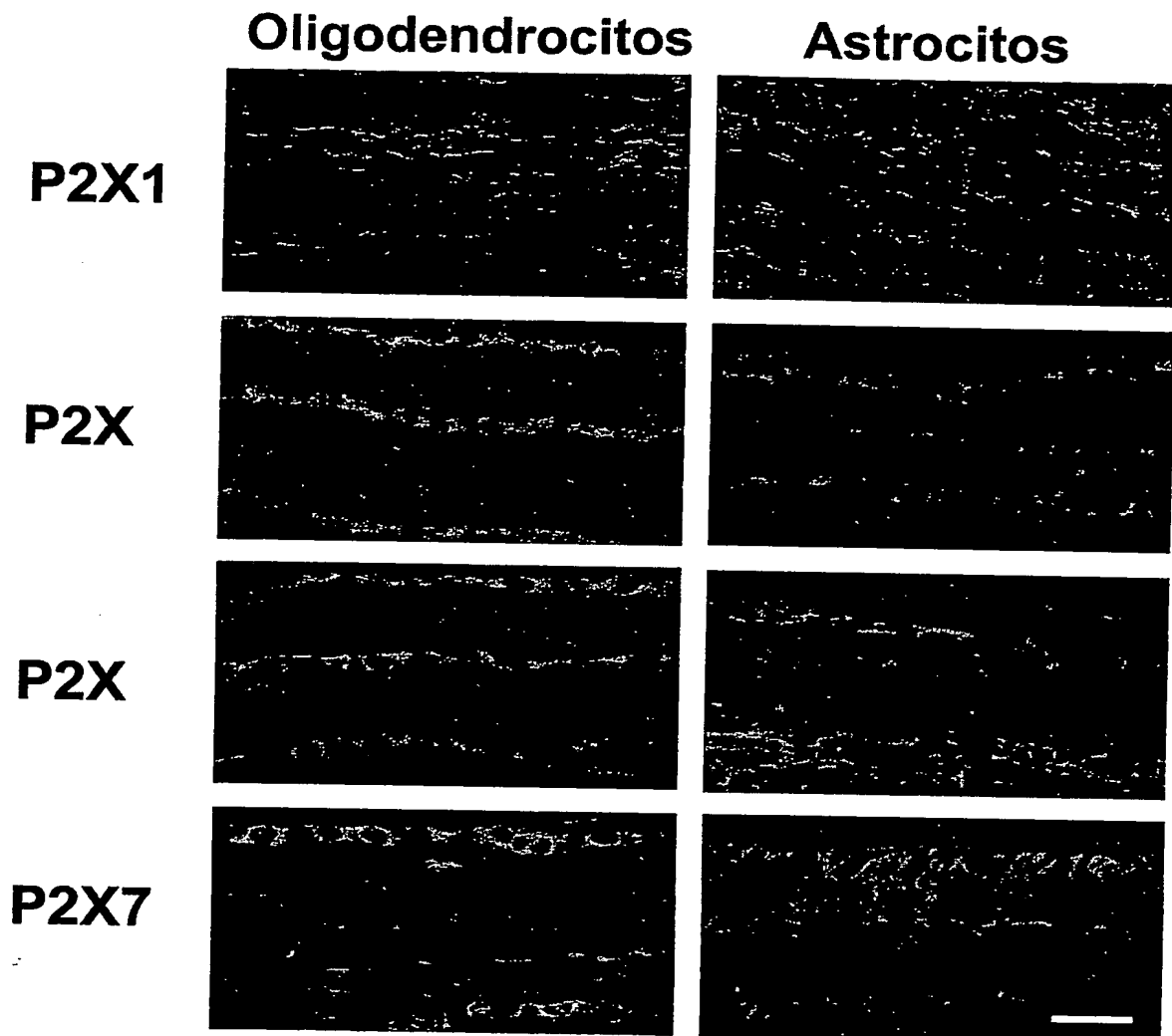


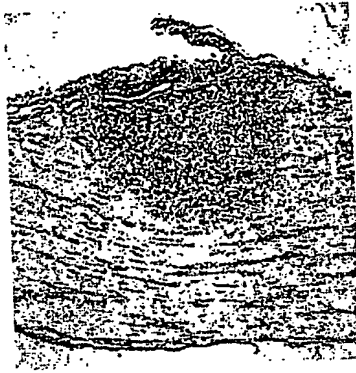
Figura 5



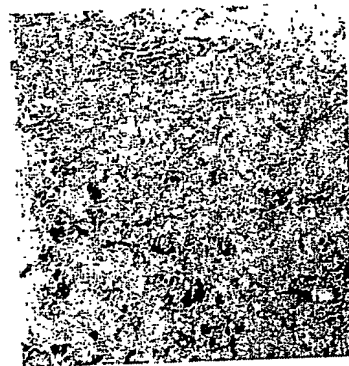
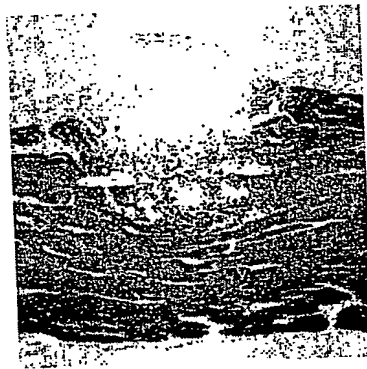
3
6
9
12
15
18

Figura 6

DAÑO
TISULAR



DAÑO
MIELINA



DAÑO
AXONES

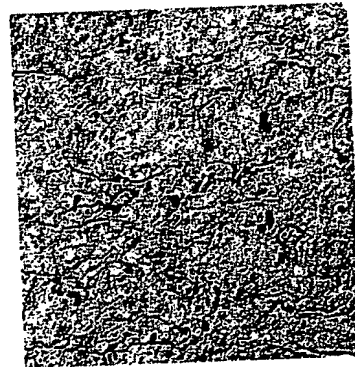
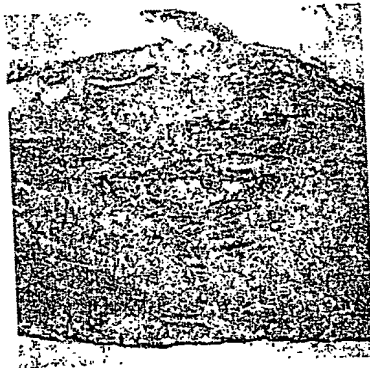


Figura 7

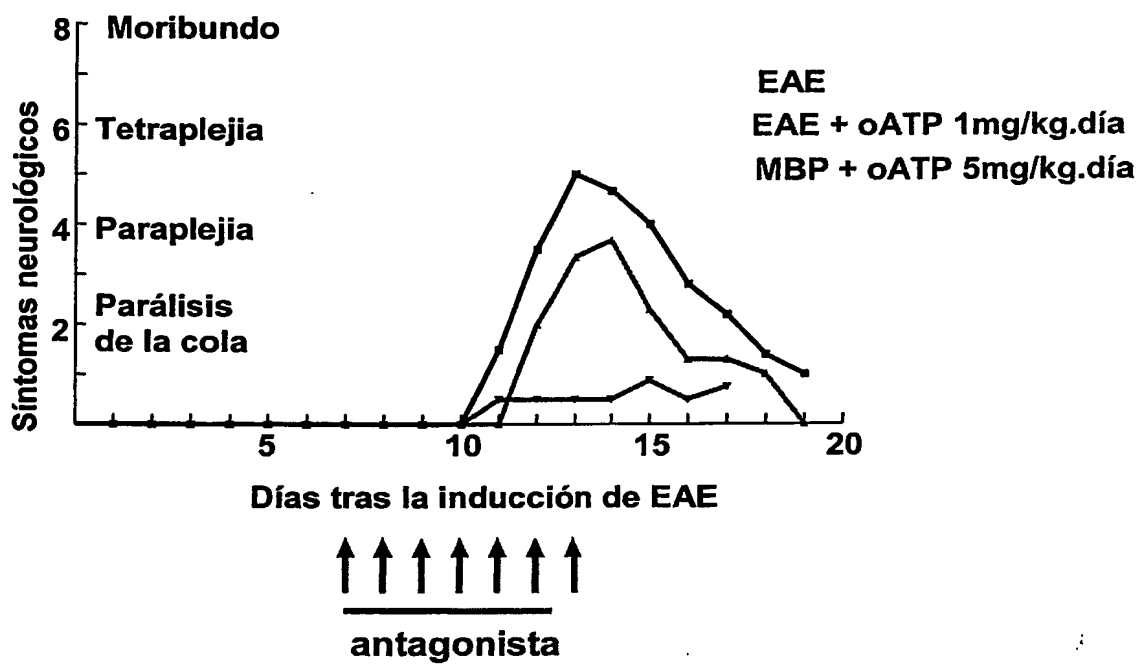


Figura 8

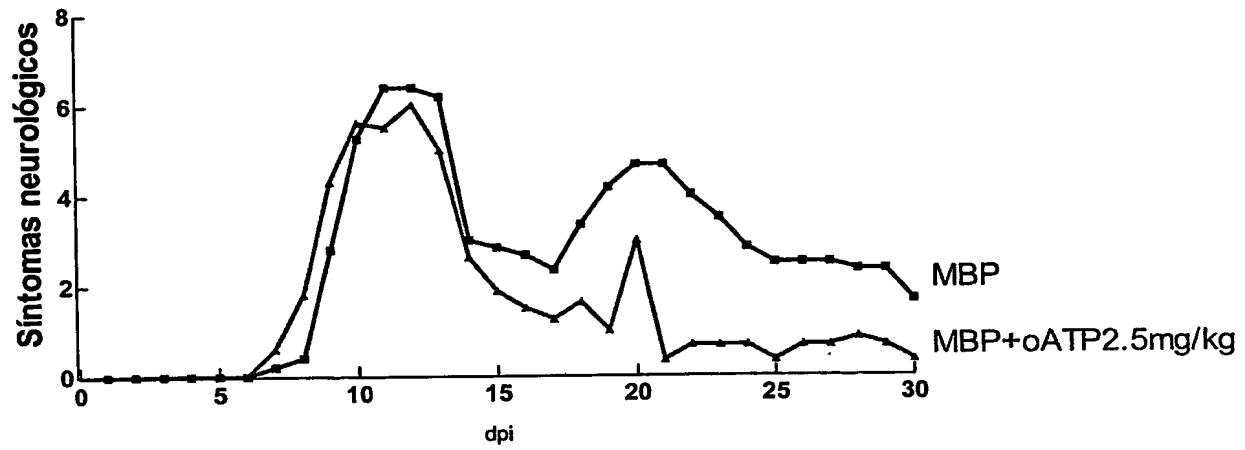
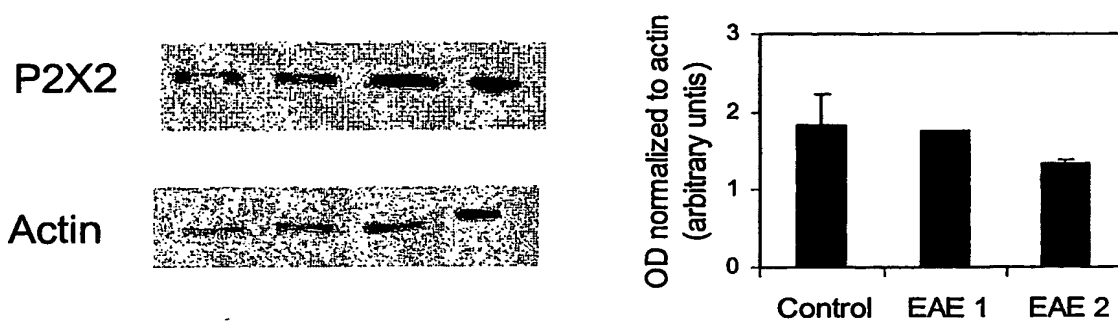
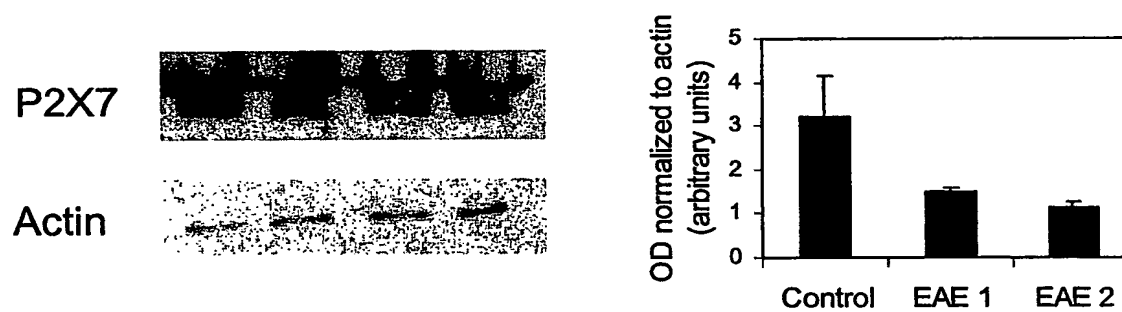


Figura 9

P2X2P2X7

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.